Aus der
Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. F. A. Gries)

Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in gezüchteten menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen - Effekt des Diabetes mellitus und der Hypercholesterinämie -

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Irmgard Dieckmann

Düsseldorf 1983

LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543914_0042

Aus der
Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. F. A. Gries)

Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in gezüchteten menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen - Effekt des Diabetes mellitus und der Hypercholesterinämie -

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Irmgard Dieckmann

Düsseldorf 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf : Prof. Dr. A. Hopf

Referent : Prof. Dr. F. A. Gries
Korreferent : Prof. Dr. H. E. Bojar

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Methodik	5
2.1.	Material	5
2.2.	Serumarten	6
2.3.	Zellinien	8
2.4.	Zellzüchtung	13
2.5.	Aufarbeitung der gezüchteten Zellen vor der Messung der Cathepsin D-, Cathespin B- und Aminopeptidasen-Aktivität	14
2.6.	Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität	17
3.	Ergebnisse	2o
3.1.	Adaptation der Methoden zur Bestimmung der Proteasenaktivität in gezüchteten menschlichen mesenchymalen Zellen	2o
3.1.1.	Ultrabeschallung der Zellen	2o
3.1.2.	Cathepsin D	2o
3.1.3.	Cathepsin B	27
3.1.4.	Aminopeptidasen	32
3.2.	Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität in menschlichen mesenchymalen Zellen	37
3.2.1.	Zellulär fixierte Eigenschaften	37
3.2.1.1.	Fibroblasten und arterielle glatte Muskelzellen von Stoffwechselgesunden	37

		Seite
3.2.1.2.	Fibroblasten von Diabetikern	4o
3.2.1.3.	Fibroblasten von Hypercholesterinämikern	45
3.2.2.	Effekte des Serums von nicht insulinpflichtigen Diabetikern auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von Diabetikern und von Stoffwechselgesunden	46
3.2.3.	Effekte des Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von Patienten mit Hypercholesterinämie und von Stoffwechselgesunden	51
4.	Diskussion	53
4.1.	Adaptation der Methoden zur Bestimmung der Proteasenaktivitäten in gezüchteten menschlichen mesenchymalen Zellen	53
4.2.	Zellulär fixierte Änderungen der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität in menschlichen mesenchymalen Zellen	54
4.3.	Serumabhängige Änderungen der Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in menschlichen mesenchymalen Zellen	56
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung und Fragestellung

Der Diabetes mellitus und die Hypercholesterinämie sind als Risikofaktoren für degenerative Gefäßerkrankungen bekannt (13).

In retrospektiven Studien ist aufgezeigt worden, daß die Lebenserwartung der Diabetiker und Hypercholesterinämiker deutlich geringer ist als die der Stoffwechselgesunden, wobei die angiopathischen Komplikationen eine ursächliche Rolle spielen (12).

Bei der Entwicklung der Arteriosklerose sind Störungen des Proteinstoffwechsels beschrieben worden, die zur abnormen Akkumulation von Glykoproteinen in der Arterienwand beitragen können (8,14, 34). Ein wichtiger Abschnitt im Bereich der Proteinstoffwechselstörungen betrifft den Proteinkatabolismus und die daran beteiligten lysosomalen und extralysosomalen Enzyme.

Coffey und de Duve (5) beschreiben, daß vorwiegend lysosomale Enzyme für den intrazellulären Proteinabbau verantwortlich sind. Das Aktivitätsoptimum lysosomaler Proteasen (Cathepsin B, C, D, E, H) findet sich hauptsächlich im sauren pH-Bereich, wobei Cathepsin D als Schlüsselenzym für den LDL-Abbau angesehen wird (5,23,30).

Bei Ratten mit streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus wurde in arteriellen glatten Muskelzellen der Aorta eine Minderung der Aktivität der Alpha-Glukosidase, ß-Galaktosidase, Alpha-Mannosidase, N-Acetyl-ß-Glucosaminidase sowie von Cathepsin C saurer Alpha-Glukosidase und saurer Cholesterinesterase gemessen (15,16,18,34).

Die um 25 % verminderte Cholesterinesterase-Aktivität in der Aorta von streptozotocin-diabetischen Ratten wurde in Beziehung gesetzt zu Störungen des LDL-Abbaus in der Gefäßwand (35).

In der Arterienwand von Ratten und Kaninchen mit diät-induzierter Hypercholesterinämie waren die Cholesterinesterase-Aktivität vermindert und gleichzeitig die Cholesterinsynthese gesteigert, woraus eine vermehrte Anreicherung von Cholesterinestern resultierte (24,29,32,33).

Die vorgenannten Untersuchungsergebnisse zeigen exemplarisch, daß in der Arterienwand verschiedener Spezies beim experimentell induzierten Diabetes mellitus und bei der Hypercholesterinämie Störungen des Proteinstoffwechsels beobachtet worden sind, die mit einer Verminderung der verschiedenen lysosomalen Enzymaktivitäten einhergehen.

Im Gegensatz dazu wurde im Skeletmuskel von streptozotocin-diabetischen Ratten ein ausgeprägter Anstieg der Aminopeptidasen-Aktivität beobachtet, der in Zusammenhang zum gesteigerten Proteinabbau des Skeletmuskels beim Diabetes mellitus gestellt worden ist (6,7). Die Aminopeptidasen werden den extralysosomalen Proteasen zugeordnet (21,31).

In wieweit diese tierexperimentellen Ergebnisse des induzierten Insulinmangeldiabetes und der Hypercholesterinämie übertragbar sind auf die Pathomechanismen des menschlichen Diabetes mellitus und der Hypercholesterinämie, ist noch offen.

Bisher fehlten Untersuchungen der lysosomalen und extralysosomalen Proteasen an menschlichen mesenchymalen Zellen von Diabetikern und Hyperchol-

esterinämikern. Da unter in vivo Bedingungen beim Menschen pathogenetische Untersuchungen zum Verhalten der Proteasen in der Gefäßwand praktisch nicht durchführbar sind, und außerdem in vivo nicht zwischen zellulären und extrazellulären Ursachen von Störungen des Proteinabbaus differenziert werden kann, sollten mesenchymale menschliche Zellen in vitro unter Zellkulturbedingungen untersucht werden. Dabei ist die Möglichkeit gegeben, zellulär fixierte und serumspezifische Faktoren einzeln und in Kombination zu untersuchen.

Es bot sich deshalb an, Fibroblasten von Diabetikern, Hypercholesterinämikern und von stoffwechselgesunden Kontrollen sowie arterielle glatte Muskelzellen zu züchten und auf Veränderungen von lysosomalen und extralysosomalen Proteasenaktivitäten zu untersuchen. Um Rückschlüsse auf metabolische Faktoren als Ursache von Enzymaktivitätsänderungen ziehen zu können, wurden Seren von Diabetikern und Hypercholesterinämikern im Vergleich zu denen Stoffwechselgesunder zur Zellzüchtung verwendet.

Als Beitrag zur Klärung der Pathogenese der Arteriosklerose beim menschlichen Diabetes mellitus und der Hypercholesterinämie wurden im einzelnen folgende Fragen geprüft:

1. Sind zellulär fixierte Änderungen der Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in gezüchteten
   a) arteriellen glatten Muskelzellen
   b) Diabetikerfibroblasten
   c) Hypercholesterinämikerfibroblasten
   im Vergleich zu Fibroblasten von Stoffwechselgesunden nachweisbar?

2. Werden die Aktivitäten von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen dieser menschlichen mesenchymalen Zellen durch Serumfaktoren von
   a) Typ II-Diabetikern
   b) Patienten mit primärer Hypercholesterinämie
   im Vergleich zu Stoffwechselgesunden beeinflußt?

Voraussetzung dafür war die Adaptation der an verschiedenen Geweben etablierten Proteasenmethoden (3,4,21,31) an die Bedingungen der gezüchteten Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen von Menschen.

2. Methodik

2.1. Material

Dulbeccos Modification des Eagleschen Mediums (DME) (9,1o)mit 5 mM Glukose; Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration im Zellinkubationsmedium: Penicillin 5o E/ml, Streptomycin 5o µg/ml); foetales Kälberserum und phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) von Seromed GmbH, München; Falcon Gewebekulturschalen und -flaschen von Beckton & Dickinson, Heidelberg; Natrium-dihydrogenphosphat-2-hydrat, Di-kaliumhydrogen-phosphat, Natriumnitrit, o-Phosphorsäure, Borsäure, Brij 35 (w/v); L-Leucin-4-nitroanilid , 4-Amino-2,3-dimethylazobenzol, 3,5-Diaminobenzoesäure, Kaliumjodid, Folin-Ciocalteau-Reagenz, Trichloressigsäure und Aktivkohle von Merck, Darmstadt; N-alpha-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid, ß-Naphtylamin, Dithiothreitol, Desoxyribonucleinsäure aus Kälberthymus und Pepstatin von Serva Feinbiochemika, Heidelberg; Mersalylsäure von Sigma Chemie GmbH, München; Quickszint 212 von Zinsser, Frankfurt; LAB-TROL von Dade, Miami, Florida, USA; Leupeptin von Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf, Schweiz; mit $K^{14}CNO$ (Amersham Buchler, Braunschweig) markiertes Rinderhämoglobin (28) (Spezifische Aktivität 1,3 - 1,7 µCi/mmol) wurde zur Verfügung gestellt von Dr. B. Dahlmann, Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf, Biochemische Abteilung.

2.2. Serumarten

Personen, die 12 - 15 Stunden nüchtern waren, wurde morgens Venenblut entnommen. Dieses wurde eisgekühlt, dann 15 Min. mit 1500 x g bei 4° C zentrifugiert, Serum von je 6 - 10 Personen wurde gemischt, durch Filtration (0,22 µ) sterilisiert und portionsweise bei - 20° C 1-3 Wochen aufbewahrt.

Es wurden benutzt:

1) Mischseren von nicht insulinpflichtigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung ohne Ketose, die mit Sulfonylharnstoffen behandelt wurden,
2) Mischseren von Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie und
3) Mischseren von Stoffwechselgesunden.

Die Konzentration der Blutglukose wurde mit der Hexokinase-Methode (Boehringer-Mannheim), die des Serumcholesterins mit der Chod-Pap-Methode (Boehringer-Mannheim) und die der Serumtriglyceride vollenzymatisch (Boehringer-Mannheim) bestimmt. Die Serumkonzentration von Insulin wurde dankenswerterweise von Prof. Grüneklee, Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf, gemessen. Die Bestimmung erfolgte mittels RIA-Phadebas (Pharmacia, Freiburg).
In der Tabelle 1 sind die Konzentrationsbereiche dieser vier gemessenen Parameter aufgezeigt.

Tabelle 1

Konzentrationsbereiche des Glukose-, Cholesterin-, Triglycerid- und Insulingehaltes in Seren von

1. nicht insulinpflichtigen Diabetikern (DS), (n=3)
2. Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie (HS), (n=2)
3. Stoffwechselgesunden (NS), (n=5)

	Glukose mg/dl	Cholesterin mg/dl	Triglyceride mg/dl	Insulin µU/ml
DS	2o5-245	18o-225	218-249	22-34
HS	92-11o	243-339	77-154	18-28
NS	9o-1oo	142-159	42-1o4	7-14

2.3. Zellinien

Untersucht wurden Hautfibroblasten von je 2 Patienten mit primärem Typ I oder Typ II Diabetes mellitus, von 3 Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie und von 8 Stoffwechselgesunden sowie arterielle glatte Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden. Nähere Angaben zu den verschiedenen Zellinien sind in den Tabellen 2 - 5 enthalten.

Die in Tabelle 3 genannte Zellinie Nr. 1 wurde von Prof. Steinberg, University of California, San Diego, USA, zur Verfügung gestellt. Die klinischen Daten und die Diagnosen von den übrigen Fibroblastenspendern wurden in der Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes, Düsseldorf, während ambulanter und stationärer Aufenthalte ermittelt.

Die arteriellen glatten Muskelzellen wurden von Dr. Carew, University of California, San Diego, USA, etabliert und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit primärem Diabetes mellitus (D)

	Geschlecht	Alter (Jahre)	D-Typ	Familiäre D-Belastung	D-Dauer (Jahre)	D-Spätschäden
1	w	1o	IDDM	ja	1	keine
2	w	17	IDDM	ja	3	keine
3	w	25	NIDDM	ja	2	keine
4	w	4o	NIDDM	ja	5	keine

IDDM = insulinpflichtiger Diabetes mellitus
NIDDM = nicht insulinpflichtiger Diabetes mellitus

Tabelle 3

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie (HLP)

	Geschlecht	Alter (Jahre)	Familiäre HLP-Belastung	HLP-Dauer seit Diagnose (Jahre)	HLP-Spätschäden
1	w	19	beide Eltern und 1 Schwester	1o	Herzinfarkt
2	w	23	1 Elternteil und 1 Bruder	7	tuberöse Xanthome, koronare Herzkrankheit
3	w	14	1 Elternteil und 1 Schwester	5	tuberöse Xanthome

Tabelle 4

Zellinien (Hautfibroblasten) von Stoffwechselgesunden

	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	m	17
2	m	22
3	w	27
4	m	31
5	m	37
6	w	41
7	m	44
8	m	49

Tabelle 5

Zellinie (arterielle glatte Muskelzelle) von einem Stoffwechselgesunden

	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gewebeursprung	Anlaß für Entnahme	Zellkulturlabor der Primärkultur
1	m	2o	Arteria femoralis	Tod nach Verkehrsunfall	Prof. Steinberg, University of California, San Diego, USA

2.4. Zellzüchtung

Die Fibroblastenkulturen wurden von Frau Dipl. Biol. Ch. Bünting, Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf, in folgender Weise angelegt:

freiwilligen Personen wurde eine ca. 3 x 3 mm große Hautbiopsie aus dem Oberarmbereich unter sterilen Bedingungen in Lokalanästhesie entnommen. Das Gewebestück wurde in PBS gewaschen, mit einem Skalpell zerkleinert und unter Deckplättchen in Plastikgewebekulturschalen (6o mm Ø = 28,3 mm^2) in DME + 1o % foetalem Kälberserum in einem Brutschrank bei 37° C in 5 % CO_2/ 95% angefeuchteter Luft 3-4 Wochen bei zweimaligem Mediumwechsel pro Woche gezüchtet. Nachdem die ausgewachsenen Fibroblasten mit typischem licht- und elektronenmikroskopischem Aussehen einen ersten konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie mit o,o5 %iger Trypsinlösung abgelöst, im Verhältnis 1:2 auf Gewebekulturschalen verteilt und in dieser Weise zur weiteren Zellzahlvermehrung bis zur 2.-4. Passage weitergezüchtet. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Teil der Fibroblasten in DME unter Zusatz von 2o% foetalem Kälberserum (v/v) und 1,28 M $DMSO_4$ unter kontrollierten Bedingungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -196° C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Die Primärkultur der arteriellen glatten Muskelzellen wurde in dem in Tabelle 5 angegebenen Zellkulturlabor in typischer Weise angelegt (27) und auf Zellspezifität überprüft. In der 3.-4. Passage wurde ein Teil dieser Zellinie in das Diabetes-

Forschungsinstitut, Düsseldorf, überführt, unter den genannten Bedingungen weitergezüchtet, eingefroren, in Ampullen bei -196° C aufbewahrt und bei Bedarf entnommen.

Alle Zellinien wurden auf Mykoplasmen untersucht und waren frei von Mykoplasmenkontamination (2).

2.5. Aufarbeitung der gezüchteten Zellen vor Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität

Zur Messung der intrazellulären Proteasenaktivität (Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen) wurden die Fibroblasten von Diabetikern (DF), von Hyper-LDL-Cholesterinämikern (HCH-F) und von Stoffwechselgesunden (NF) sowie die arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) in standardisierter Weise in Zellkulturschalen von 1oo mm Ø = 78,5 cm^2 in 7 ml DME + 1o % Humanserum (v/v) bei 37° C in 5 % CO_2/95 % angefeuchteter Luft 6-8 Tage bis zur Konfluenz gezüchtet. Das Inkubationsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. 24 Stunden vor der Aufarbeitung der Zellen wurde das Inkubationsmedium zum letzten Mal gewechselt. Von diesem Inkubationsmedium wurden vor und nach 24stündiger Zellinkubation Proben (1 ml) entnommen und bis zur gleichzeitigen Messung mit der intrazellulären Proteasenaktivität bei 0° C aufbewahrt.

Für diese Untersuchungen wurden Zellen der 3.-7. Passage benutzt.

Parallel zu den Zellinien von Diabetikern und Hyper-LDL-Cholesterinämikern wurden Kontrollinien von Stoffwechselgesunden unter gleichen Bedingungen gezüchtet.

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die Zellkulturschalen auf 0° C abgekühlt und dreimal mit je 8 ml eisgekühlter PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einem Plastikschaber von der Kulturschale gelöst, in 8 ml PBS eingesammelt und bei 4° C 5 Min. mit 8ooo x g zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml eisgekühlter PBS aufgeschwemmt und unter Eiskühlung 3 x 5 Sekunden mit je 5 Sekunden Intervall ultrabeschallt (Branson Sonifier, Stufe 6). Nach der Ultrabeschallung wurde der Homogenisierstab zusätzlich mit o,5 ml PBS abgespült, sodaß das Gesamtvolumen des Zellhomogenates 1,5 ml betrug.

Aus dem Zellhomogenat von 1,5 ml wurden Proben zur Bestimmung des Proteingehaltes entnommen (22) und das Homogenat mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 2oo µg/ml Zellhomogenat verdünnt. Als Standard für die Proteinbestimmung wurde LAB-TROL-Kontrollserum benutzt.

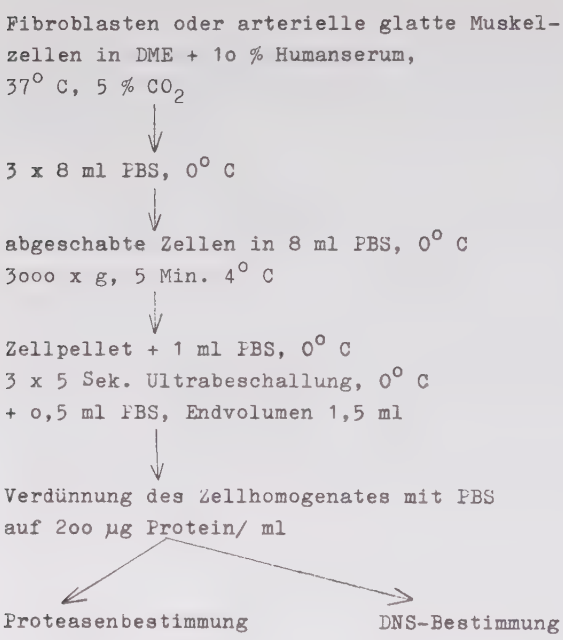
Vom verdünnten Zellhomogenat wurden Proben zur Bestimmung des DNS-Gehaltes (17) entnommen.

Die Herstellung des Zellhomogenates zur Bestimmung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität ist in Abbildung 1 zusammengefaßt.

Wirkungsunterschiede der verschiedenen Seren auf die Proteasenaktivitäten in der gleichen Zellinie wurden mit Hilfe des t-Testes für verbundene Stichproben, Unterschiede der Proteasenaktivitäten zwischen verschiedenen Zellinien mit dem t-Test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz überprüft.

Abbildung 1

Herstellung des Zellhomogenates zur Bestimmung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität



2.6. Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität

Cathepsin D

Die Messung der Cathepsin D-Aktivität wurde in modifizierter Weise nach den Angaben von Alan J. Barret (4) unter Verwendung von ^{14}C-Hämoglobin durchgeführt.

Im Gegensatz zu Barret , der mit parenchymalen Geweben verschiedener Spezies arbeitete, wurde in der vorliegenden Arbeit die Cathepsin D-Aktivität in mesenchymalen menschlichen Zellen gemessen, die unter Zellkulturbedingungen mit homologen Seren gezüchtet wurden.

Für die Bestimmung der Proteasenaktivität in diesen Zellen lagen bisher keine optimierten Testbedingungen vor. In o,5 ml 1 M Citrat-HCl-Puffer wurde das klassische Testsubstrat ^{14}C-Hämoglobin (6mg/Test) verwendet, dessen Spaltprodukte im Trichloressigsäureüberstand messbar sind.

Als Maß der Cathepsin D-Aktivität wurde die freigesetzte Radioaktivität (CPM/µg DNS) angegeben. Zur Charakterisierung der spezifischen Enzymaktivität wurde Pepstatin, ein spezifischer Cathepsin D-Blocker, eingesetzt.

Zusätzlich wurde die Cathepsin D-Aktivität im Inkubationsmedium (DME + 1o % Humanserum) vor und nach 24stündiger Zellexposition gemessen (CPM/7 ml) und in Beziehung gesetzt zur zellulären Cathepsin D-Aktivität/78,5 cm^2.

Cathepsin B

Die Cathepsin B-Aktivität wurde ebenfalls nach der Methode von Alan J. Barret gemessen (3), der aber die Aktivität nur in parenchymalen Geweben nachgewiesen hat. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Methode zur Messung der Cathepsin B-Aktivität in mesenchymalen menschlichen Zellen zunächst optimiert als Voraussetzung für die nachfolgenden Vergleiche zwischen verschiedenen Zellinien und Serumeffekten.

Als Testsubstrat wurde Alpha-N-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid verwendet, welches von Cathepsin B gespalten wird. Das freigesetzte Naphtylamin wird mit 4-Diazo-2'3-dimethylazobenzol (Fast Garnet) zu einem roten Farbkomplex gekoppelt, der photometrisch gemessen werden kann.

Als Maßeinheit der Cathepsin B-Aktivität wurde pkatal/µg DNS gewählt (1 Katal = 1 Mol Substratumsatz pro Sekunde). Zur Charakterisierung der spezifischen Enzymaktivität wurde Leupeptin, ein Cathepsin B-Blocker, eingesetzt.

Die extrazelluläre Cathepsin B-Aktivität wurde nur im Serum gemessen, da das im Inkubationsmedium enthaltene Phenolrot mit dem Farbreagenz des Standardtestes interferierte.

Aminopeptidasen

Die Aminopeptidasen-Aktivität wurde nach der Methode von Wachsmuth (31) gemessen.

Als Testsubstrat wurde Leucin-p-Nitroanilid in o,1 M Borat-Citrat-Phosphat-HCl-Puffer verwendet.

Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung der Aminopeptidasen beruht auf der photometrischen Messung des durch die Aminopeptidasen freigesetzten Leucin-p-Nitroanilins.

Als Maßeinheit der Aminopeptidasen-Aktivität wurde pkatal/µg DNS gewählt.

Zusätzlich wurde die Aminopeptidasen-Aktivität im Inkubationsmedium (DME + 1o % Humanserum) vor und nach 24stündiger Zellexposition gemessen (CPM/7 ml) und in Beziehung gesetzt zur zellulären Aminopeptidasen-Aktivität/78,5 cm^2 .

3. Ergebnisse

3.1. Adaptation der Methoden zur Bestimmung der Proteasenaktivität in gezüchteten menschlichen mesenchymalen Zellen

3.1.1. Ultrabeschallung der Zellen

Es wurde die Cathepsin D- und die Cathepsin B-Aktivität nach einer Beschallungsdauer der Zellen von 1o bis 4o Sekunden mit 5 Sekunden Kühlungsintervallen gemessen; die Aktivität erwies sich dabei als konstant (Tab. 6). Im Phasenkontrastmikroskop waren nach 15 Sekunden Beschallungsdauer keine intakten Zellen im Homogenat mehr nachweisbar.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde eine Beschallungsdauer von 15 Sekunden gewählt.

3.1.2. Cathepsin D

Die Cathepsin D-Aktivität wurde im pH-Bereich 1,5 - 6,o geprüft. Das pH-Optimum lag bei pH 3,6 (Abb. 2). Die Enzymaktivität erhöhte sich linear in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im untersuchten Bereich von 5 bis 4o µg Protein/Test (Abb. 3). Die Cathepsin D-Aktivität stieg zeitabhängig im Bereich von 2o bis 12o Minuten linear an (Abb. 4).

Für die weiteren Versuchsreihen wurden folgende Standardmeßbedingungen gewählt (Abb. 5): Gesamtvolumen je Test: o,5 ml, bestehend aus 1M Citrat-HCl-Puffer, pH 3,5, 6 mg ^{14}C-Hämo-

globin und 2o µg Protein des verdünnten Zellhomogenates, nach dessen Zugabe sich der pH auf einen Endwert von 3,6 einstellte. Die Inkubationszeit für dieses Testsystem betrug 6o Min. bei 37° C. Der Reaktionsablauf wurde durch Zugabe von o,3 ml eiskalter 5o %iger Trichloressigsäure (w/v) gestoppt. Das Proteinpräzipitat wurde 5 Min. mit 8ooo x g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 32oo). Aus dem zentrifugierten Überstand wurden o,2 ml entnommen und darin die freigesetzte Radioaktivität im ß-Counter gemessen, die als Maß der Cathepsin D-Aktivität (CPM/µg DNS) diente.

Leerwertproben ohne Zusatz des Zellhomogenates wurden parallel bestimmt. Je Meßpunkt wurden drei getrennte Proben untersucht.

Durch Zugabe von Pepstatin (6o µmol/l) zum Versuchsansatz konnte die Cathepsin D-Aktivität um 84 % gehemmt werden.

Tabelle 6

Cathepsin D- und Cathepsin B-Aktivität in Abhängigkeit von der Beschallungsdauer (1o-4o Sekunden mit 5 Sekunden Kühlungsintervallen, Branson Sonifier, Stufe 6)

Beschallungszeit (Sekunden)	Cathepsin D (CPM/µg Protein)	Cathepsin B (pkatal/1o µg Protein)
1o	168o 1732	5,87 6,o6
15	172o 176o	5,61 5,36
2o	173o 1756	5,49 5,74
25	17o4 1746	5,74 5,96
3o	1664 1688	5,78 5,86
4o	1756 175o	5,63 5,47

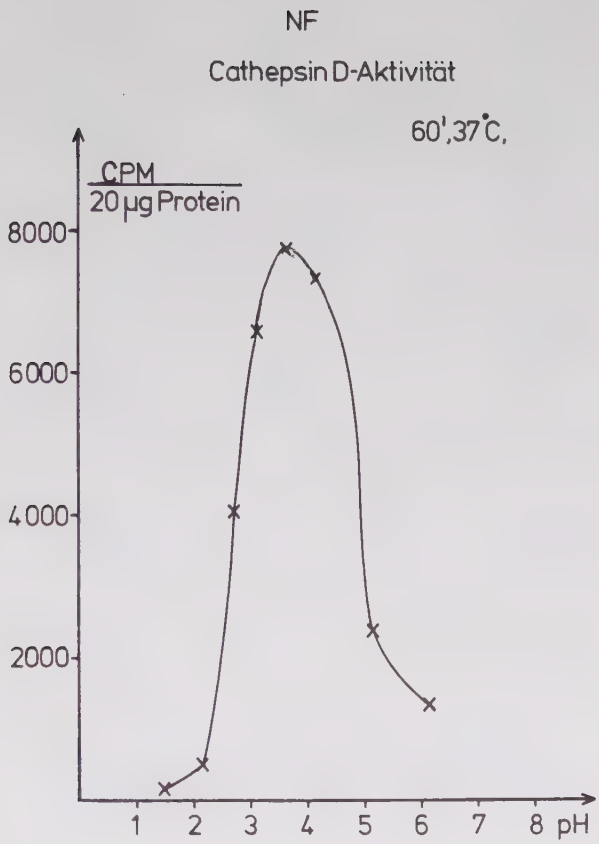


Abbildung 2

Cathepsin D-Aktivität (CPM/ 2o µg Protein x 6o Min.$^{-1}$ bei 37° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit vom pH.

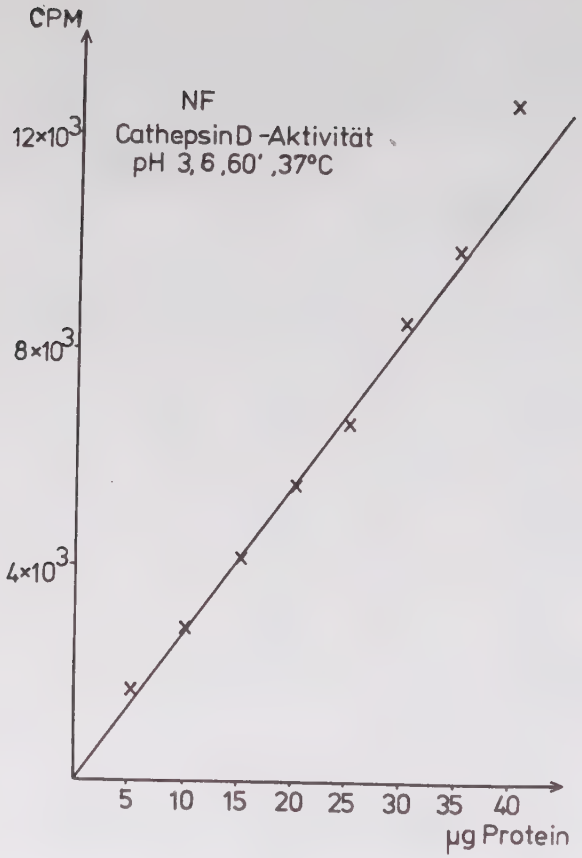


Abbildung 3

Cathepsin D-Aktivität (CPM x 6o Min. $^{-1}$ bei 37° C, pH 3,6) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

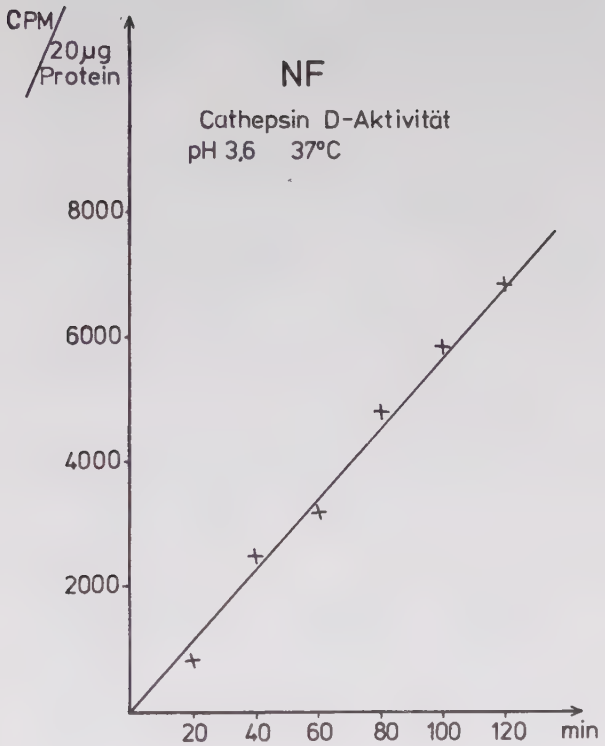
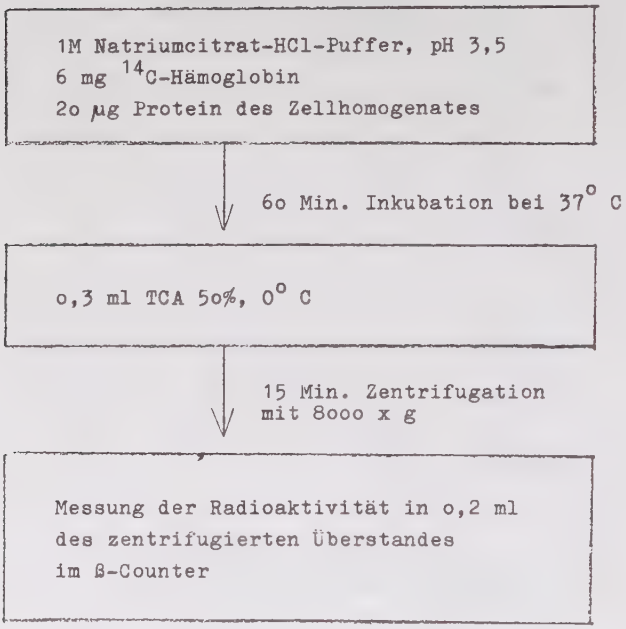


Abbildung 4

Cathepsin D-Aktivität (CPM/2o µg Protein bei 37° C, pH 3,6) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Abbildung 5

Standardinkubationssystem für die Messung der Cathepsin D-Aktivität (CPM/µg DNS) unter Verwendung von ^{14}C-Hämoglobin als Substrat in o,5 ml Inkubationsvolumen



3.1.3. Cathepsin B

Die Cathepsin B-Aktivität wurde im pH-Bereich 4,5 - 7,o geprüft. Das pH-Optimum lag bei pH 5,5 (Abb. 6). Die Enzymaktivität erhöhte sich linear in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im untersuchten Bereich von 2o bis 8o µg Protein/Test (Abb. 7). Die Cathepsin B-Aktivität stieg zeitabhängig im Bereich von 5 bis 25 Minuten linear an (Abb. 8).

Für die nachfolgenden Messungen wurde folgendes Meßsystem gewählt (Abb. 9):
Das Inkubationssystem enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,o5 ml/Testansatz o,2 M Phosphatpuffer pH 5,5, 1,33 mM Na_2-EDTA, o,5 mM Dithiothreitol, o,15 % (v/v) Äthanol, 4o µg des verdünnten Zellhomogenates und o,1 mM Substrat. Als Inkubationszeit für dieses Testsystem wurden 2o Min. bei 37° C gewählt. Durch Zugabe von 2 ml Farbreagenz wurde der Reaktionsablauf gestoppt. Die Konzentration des enzymatisch freigesetzten ß-Naphtylamids wurde bei 52o nm gegen H_2O gemessen.

Die Enzymaktivität wurde in pkatal/µg DNS angegeben.

Leerwertproben ohne Zusatz des Zellhomogenates wurden parallel gemessen. Je Meßpunkt wurden zwei getrennte Proben untersucht.

Leupeptin hemmte bei einer Konzentration von 2 mmol/l die proteolytische Enzymaktivität um 4o - 5o %.

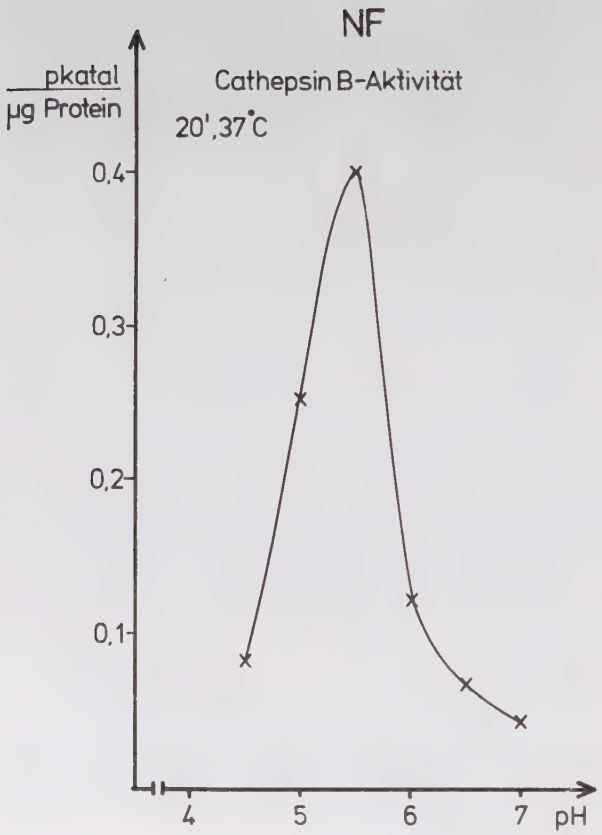


Abbildung 6

Cathepsin B-Aktivität (pkatal/ µg Protein nach 2o Min. bei 37 ° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit vom pH.

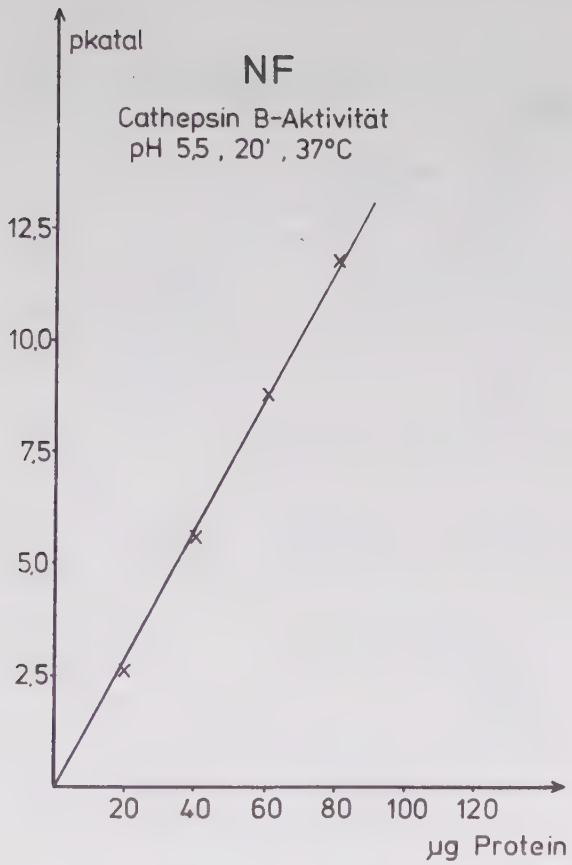


Abbildung 7

Cathepsin B-Aktivität (pkatal, pH 5,5, nach 2o Min. bei 37° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

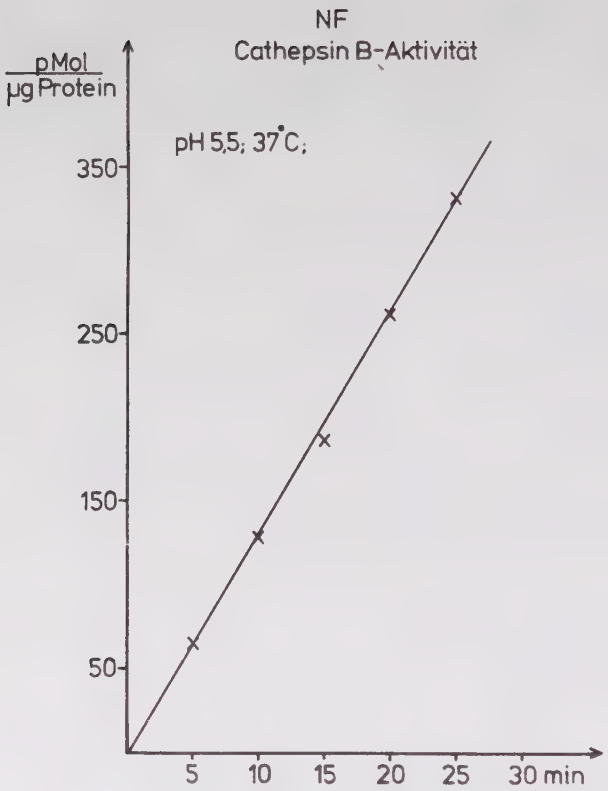
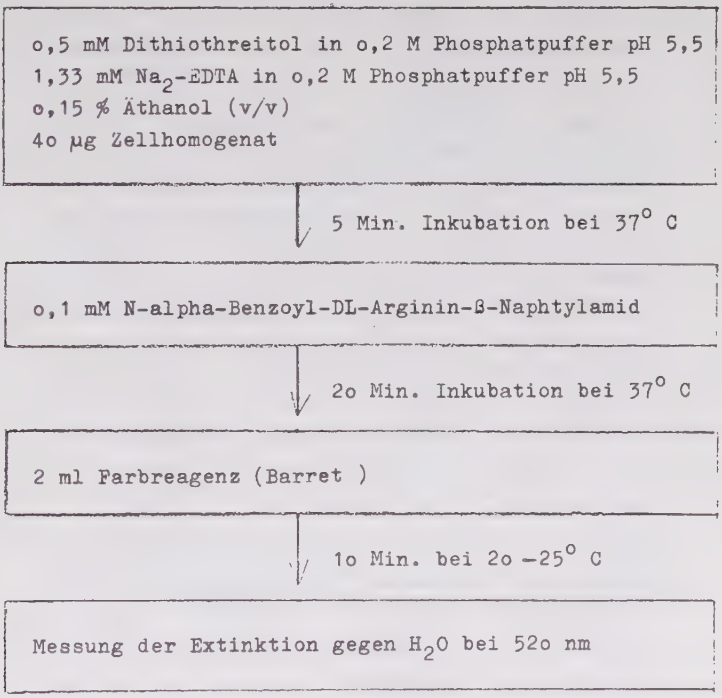


Abbildung 8

Cathepsin B-Aktivität (pMol/µg Protein, pH 5,5, 37° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Abbildung 9

Standardinkubationssystem für die Messung der Cathepsin B-Aktivität (pkatal/µg DNS) in 2,o5 ml Inkubationsvolumen



3.1.4 Aminopeptidasen-Aktivität

Die Aminopeptidasen-Aktivität wurde im pH-Bereich 6,o - 9,o geprüft. Das pH-Optimum lag bei pH 7,8 (Abb. 1o). Die Enzymaktivität erhöhte sich linear in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im untersuchten Bereich von 2 bis 2o µg Protein/Test (Abb. 11). Die Aminopeptidasen-Aktivität stieg zeitabhängig im Bereich von 1o bis 12o Minuten Inkubationsdauer linear an (Abb. 12).

Für die weiteren Versuchsreihen wurden folgende Standardmessbedingungen gewählt (Abb. 13): Gesamtvolumen je Testansatz: o,7 ml mit 2,5 mM Substrat gelöst in o,1 M Borat-Citrat-Phosphat-HCl-Puffer, pH 7,8, der 5 % (v/v) Dimethylformamid enthielt und 1o µg des verdünnten Zellhomogenates. Als Inkubationszeit für dieses Testsystem wurden 6o Min. bei 37° C gewählt. Der Reaktionsablauf wurde durch Zugabe von o,3 ml TCA 8% (w/v) gestoppt. Die Proben wurden 5 Min. bei 8ooo x g zentrifugiert und das enzymatisch freigesetzte p-Nitroanilin bei 4o5 nm gegen H_2O gemessen.

Leerwertproben mit der bereits zu Testbeginn durch Trichloressigsäure präzipitierten Zellproteinprobe wurden parallel gemessen. Je Meßpunkt wurden drei getrennte Proben untersucht.

Die Aktivität der Aminopeptidasen wurde in pkatal/ µg DNS angegeben.

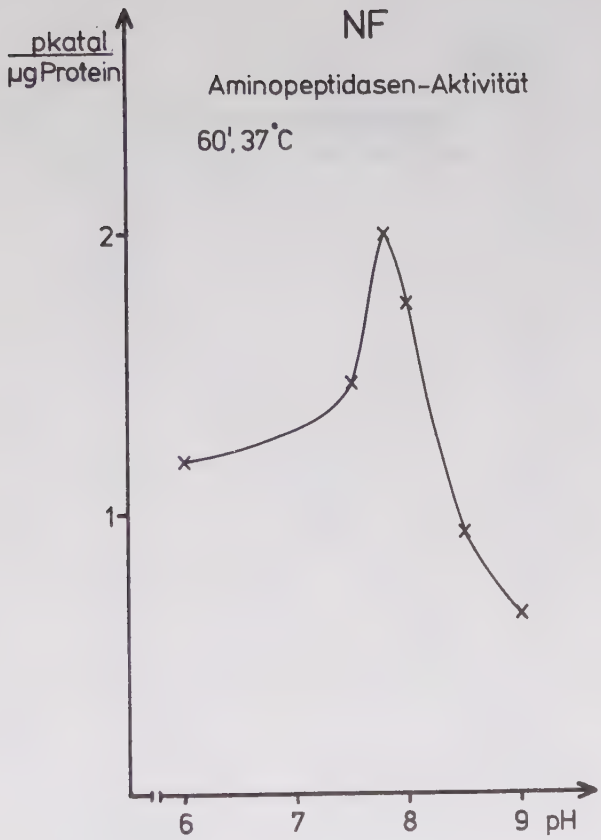


Abbildung 1o

Aminopeptidasen-Aktivität (pkatal/ µg Protein, nach 2o Min. bei 37° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit vom pH.

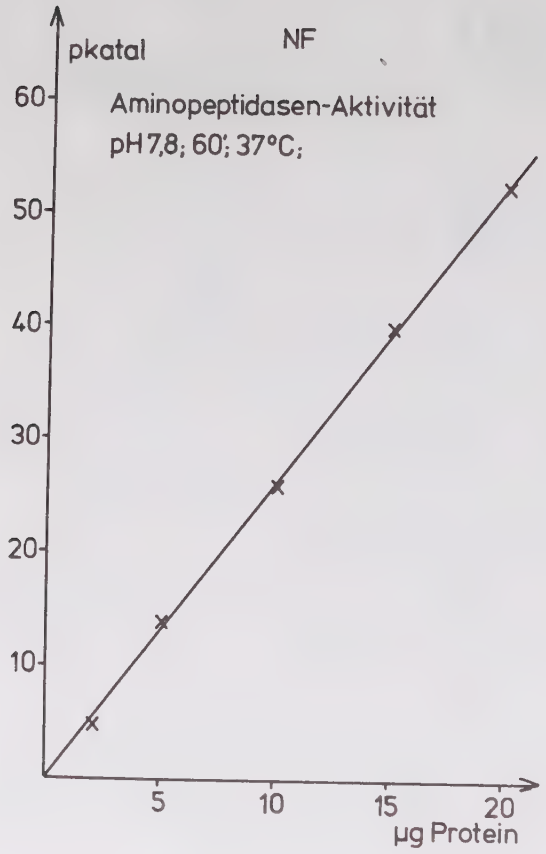


Abbildung 11

Aminopeptidasen-Aktivität (pkatal, pH 7,8, nach 6o Min. bei 37° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

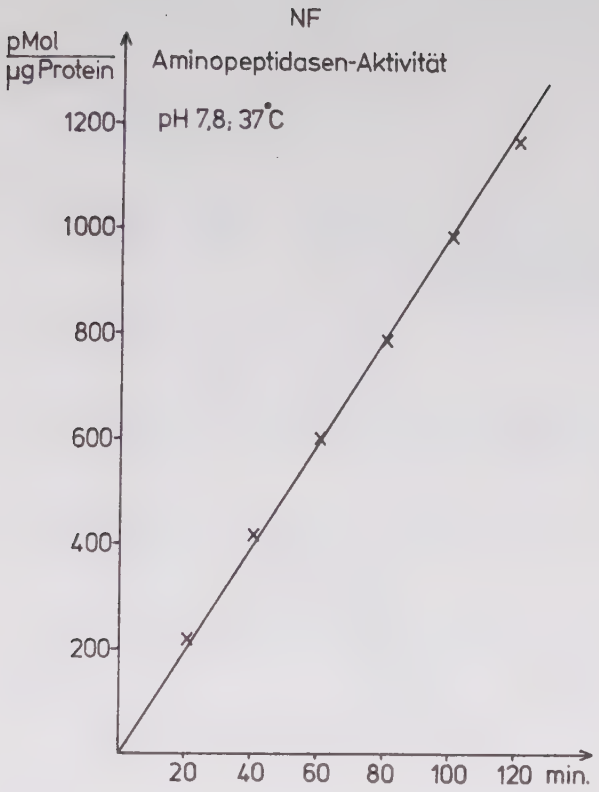
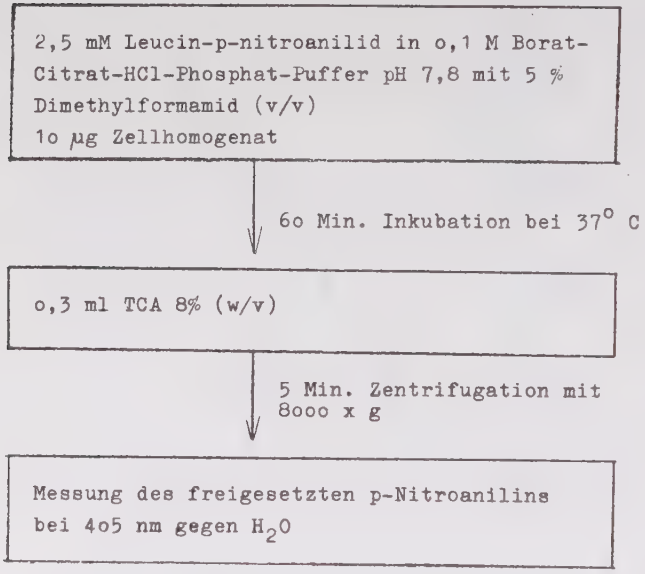


Abbildung 12

Aminopeptidasen-Aktivität (pMol/µg Protein, pH 7,8, 37° C) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Abbildung 13

Standardinkubationssystem für die Messung der Aminopeptidasen-Aktivität (pkatal/µg DNS) in o,7 ml Inkubationsvolumen



3.2. Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität in menschlichen mesenchymalen Zellen

3.2.1. Zellulär fixierte Eigenschaften

3.2.1.1. Fibroblasten und arterielle glatte Muskelzellen von Stoffwechselgesunden

Die Aktivität von Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen in arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) war im Vergleich zu Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF) in unterschiedlichem Ausmaß vermindert.

Die Cathepsin D-Aktivität in ASMC betrug 3o % der unter vergleichbaren Bedingungen in NF gemessenen Aktivität (Tab. 7).

Die Cathepsin B-Aktivität in ASMC betrug 2o % der unter vergleichbaren Bedingungen in NF gemessenen Aktivität (Tab. 7).

Die Aminopeptidasen-Aktivität in ASMC betrug 6 % der unter vergleichbaren Bedingungen in NF gemessenen Aktivität (Tab. 7).

Proteingehalt und DNS-Gehalt korrelierten in Normalfibroblasten linear (Abb. 14).

Tabelle 7

Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS) nach 6o Min., Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 8 Stoffwechselgesunden (NF) und in arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) eines Stoffwechselgesunden gezüchtet in DME + 1o % Serum von Stoffwechselgesunden

Mittelwerte ± SEM

	ASMC	NF
Cathepsin D	256 ± 18	87o ± 79
Cathepsin B	1,44 ± o,o5	7,21 ± o,39
Aminopeptidasen	3,4 ± o,2	6o,8 ± 2,4

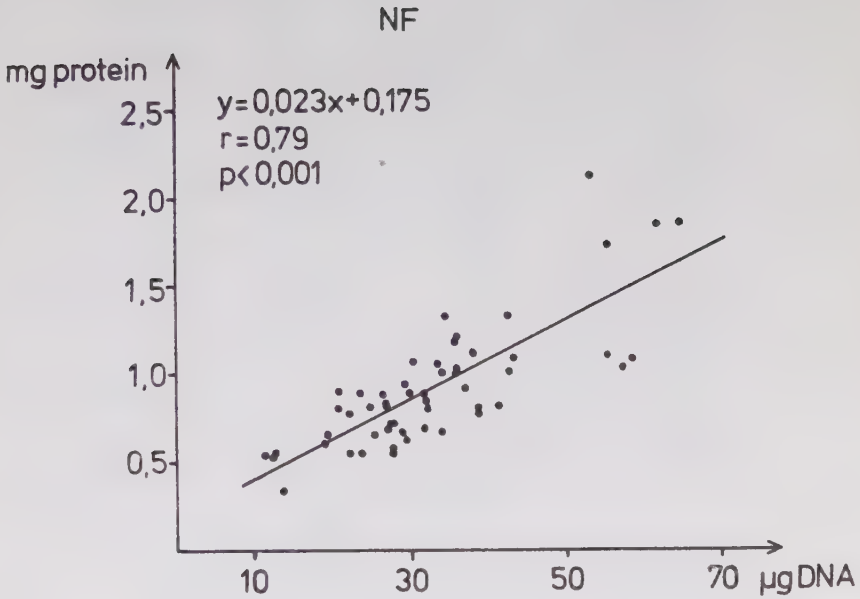


Abbildung 14

Korrelation des Proteingehaltes zum DNS-Gehalt von Fibroblasten von 8 Stoffwechselgesunden (NF).

3.2.1.2. Fibroblasten von Diabetikern

Die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS war bei vergleichbarer Zelldichte in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF; n=5) und Diabetikern (DF; n=4) nicht unterschiedlich (Abb. 15). Dabei stieg die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS in allen NF und DF mit zunehmender Zelldichte an. Aus Abb. 15 ergibt sich, daß dieser Anstieg der Cathepsin D-Aktivität erst ab einer Zelldichte von etwa 2o µg DNS/78,5 cm^2 deutlich wird.

Die Cathepsin B-Aktivität pro µg DNS war bei vergleichbarer Zelldichte in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF; n=5) und Diabetikern (DF; n=4) ebenfalls nicht unterschiedlich (Abb. 16). In allen NF und DF stieg die Cathepsin B-Aktivität/78,5 cm^2 mit zunehmender Zelldichte linear an, wobei die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS im Gegensatz zur Cathepsin D-Aktivität (Abb. 15) unabhängig von der Zelldichte praktisch konstant blieb.

Die Aminopeptidasen-Aktivität pro µg DNS war bei vergleichbarer Zelldichte in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF; n=5) und Diabetikern (DF; n=4) nicht unterschiedlich (Abb. 17). In allen NF und DF stieg mit zunehmender Zelldichte die Aminopeptidasen-Aktivität/78,5 cm^2 linear an. Im Gegensatz zur Cathepsin D-Aktivität (Abb. 15) und in Übereinstimmung mit der Cathepsin B-Aktivität (Abb. 16) blieb die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS unabhängig von der Zelldichte praktisch konstant.

Proteingehalt und DNS-Gehalt korrelierten in Diabetikerfibroblasten linear (Abb. 18).

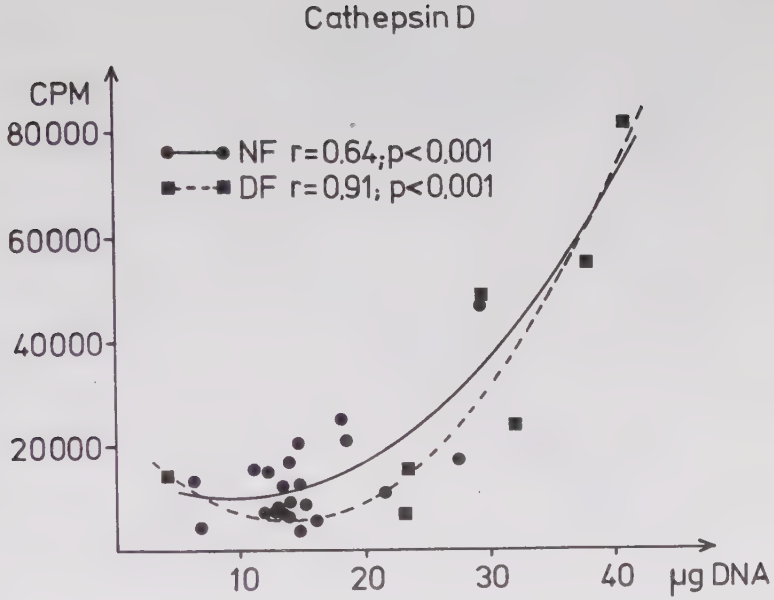


Abbildung 15

Korrelation der Cathepsin D-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 5-4o µg DNS) von Fibroblasten (gezüchtet mit Normalserum) von 5 Stoffwechselgesunden (NF: ●) und 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF: ■); yNF = $66x^2$-1286x+16o57; yDF = $97x^2$-2698x+ 24188.

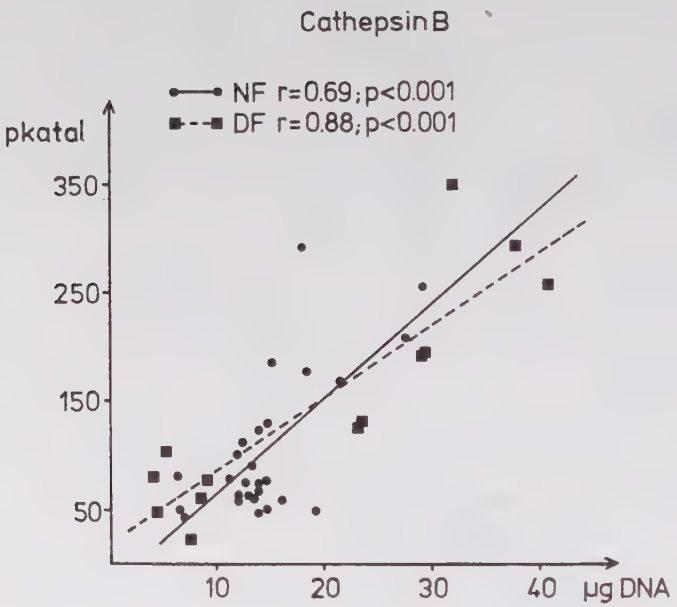


Abbildung 16

Korrelation der Cathepsin B-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 5-40 µg DNS) von Fibroblasten (gezüchtet mit Normalserum) von 5 Stoffwechselgesunden (NF:●) und 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF:■). yNF= 9x -22; yDF= 7x + 19

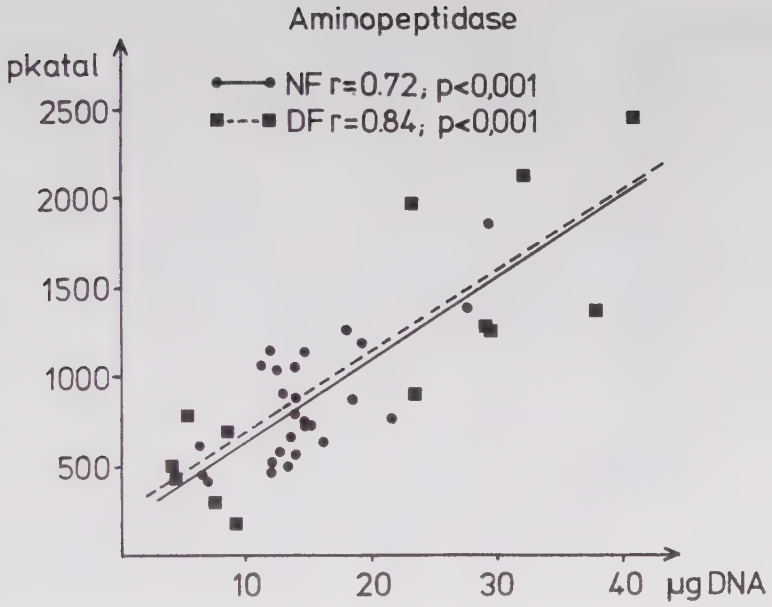


Abbildung 17

Korrelation der Aminopeptidasen-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich 5-4o µg DNS) von Fibroblasten (gezüchtet in Normalserum) von 5 Stoffwechselgesunden (NF:●) und 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF:■). yNF= 46 x + 182; yDF= 46 x + 216

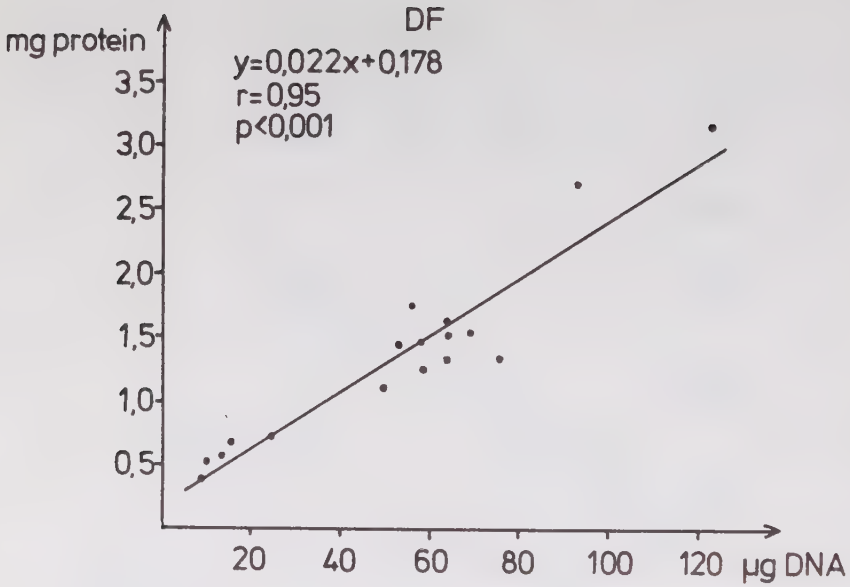


Abbildung 18

Korrelation des Proteingehaltes zum DNS-Gehalt von Fibroblasten von 4 Diabetikern (DF).

3.2.1.3. Fibroblasten von Hypercholesterinämikern

Die Cathepsin D-Aktivität war in Fibroblasten von 3 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (HCH-F) im Paarvergleich zu parallel untersuchten Fibroblasten von 7 Stoffwechselgesunden (NF) bei erheblichen DNS-Unterschieden sowohl bei Züchtung mit Normalserum als auch besonders mit Hypercholesterinämikerserum um durchschnittlich 12-31 % erniedrigt (Tab.11).

Die Cathepsin B-Aktivität pro µg DNS war in den HCH-F (n=3) im Vergleich zu den Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF; n=7) bei Züchtung mit beiden Serumtypen um durchschnittlich 14-24 % erniedrigt (Tab.11).

Die Aminopeptidasen-Aktivität pro µg DNS unterschied sich nicht in HCH-F (n=3) im Paarvergleich zu parallel untersuchten NF (n=7) (Tab. 11).

3.2.2. Effekte des Serums von nicht insulinpflichtigen Diabetikern auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von Diabetikern und von Stoffwechselgesunden

Cathepsin D

Drei Mischseren von Typ II Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) verminderten im Vergleich zu drei Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS bzw. 78,5 cm^2 in Fibroblasten von fünf Stoffwechselgesunden (NF) um durchschnittlich 37-4o % ($p<o,o5$) (Tab. 8 und 9) und von vier Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) um durchschnittlich 27-36 % ($p<o,o25$) (Tab. 8 und 9). Dieser Effekt war sowohl bei einer Zelldichte von 16 µg DNS/ 78,5 cm^2 (NF) als auch bei einer Zelldichte von 24,8 µg DNS/78,5 cm^2 (DF) nachweisbar.

Im Gegensatz zu dem zellulären Effekt des DS blieb die extrazelluläre Cathepsin D-Aktivität nahezu konstant (Tab. 9).

In den untersuchten NS und DS waren vergleichbare Cathepsin D-Aktivitäten nachweisbar.

Cathepsin B

In Fibroblasten von fünf Stoffwechselgesunden (NF) und von vier Diabetikern (DF) fand sich keine Änderung der Cathepsin B-Aktivität unter dem Einfluß von drei DS im Vergleich zu drei NS (Tab. 8).

Im Serum von Stoffwechselgesunden und von schlecht eingestellten Diabetikern ließ sich keine Cathepsin B-Aktivität nachweisen.

Aminopeptidasen

Drei DS erhöhten im Vergleich zu drei NS die Aktivität der Aminopeptidasen/µg DNS bzw. 78,5 cm^2 um durchschnittlich 9-12 % ($p<0,05$), in fünf NF um durchschnittlich 5-13 % ($p<0,01$) (Tab. 8 und 10).

Im Gegensatz zu dem zellulären Effekt des DS blieb die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität nahezu konstant (Tab.10).

Tabelle 8

Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS) nach 6o Min., Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von fünf Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte 16,o ± 2,2 µg DNS/78,5 cm^2) und von vier Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) (Zelldichte 24,8 ± 3,4 µg DNS/ 78,5 cm^2).

Mittelwerte ± SEM; + p<o,o5, ++ p<o,o25 (NS/DS)

		NS	DS
Cathepsin D	NF	1276 ± 112	8o4 ± 8o +
	DF	1672 ± 264	122o ± 2o8 ++
Cathepsin B	NF	8,55 ± o,56	8,19 ± o,45
	DF	8,34 ± o,86	9,4o ± 1,36
Aminopeptidasen	NF	62,4 ± 3,2	65,4 ± 3,4
	DF	64,8 ± 6,2	73,6 ± 6,8 +

Tabelle 9

Extra- und intrazelluläre Cathepsin D-Aktivität (CPM/78,5 cm^2) nach 6o Min. in Fibroblasten von zwei Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte 13,1 ± 1,3 µg DNS) und von zwei Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) (Zelldichte 28,5 ± 1,4 µg DNS/78,5 cm^2) gezüchtet in 7 ml DME + 1o % Serum/78,5 cm^2 von Stoffwechselgesunden (NS) bzw. von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS).

Mittelwerte ± SEM; (n) = Anzahl der Versuche

		NS	DS
DME + 1o% Serum		3594 ± 91 (2)	3675 ± 43 (2)
NF	extrazellulär	4287 ± 562 (2)	45oo ± 425 (2)
	intrazellulär	1725o ± 1675 (2)	1o437 ± 3625 (2)
DF	extrazellulär	3763 ± 345 (2)	4o7o ± 294 (2)
	intrazellulär	36352 ± 6899 (2)	23257 ± 2176 (2)

Tabelle 1o

Extra- und intrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität (pkatal/78,5 cm^2) in Fibroblasten von fünf Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte 16,o ± 2,2 µg DNS/ 78,5 cm^2) und von vier Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) (Zelldichte 24,8 ± 3,4 µg DNS/ 78,5 cm^2) gezüchtet in 7 ml DME + 1o % Serum/78,5 cm^2 von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) und von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=3).

Mittelwerte ± SEM; (n) = Anzahl der Versuche
+ p<o,oo1, ++ p<o,o1 (NS/DS)

		NS	DS
DME + 1o % Serum		153 ± 4 (8)	156 ± 4 (8)
NF	extrazellulär	166 ± 4 (8)	186 ± 4^{+} (8)
	intrazellulär	946 ± 56 (8)	1o68 ± $7o^{++}$(8)
DF	extrazellulär	168 ± 8 (8)	192 ± 6^{+} (8)
	intrazellulär	125o ± 13B (8)	1362 ± 13o (8)

3.2.3. Effekte des Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von Patienten mit Hypercholesterinämie und von Stoffwechselgesunden

Cathepsin D

Zwei Mischseren von Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie (HS) verminderten im Vergleich zu drei Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) die Cathepsin D-Aktivität in Fibroblasten von sieben Stoffwechselgesunden (NF) um durchschnittlich 26 % ($p<0,05$) und in Fibroblasten von drei Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HCH-F) um durchschnittlich 45 % ($p<0,025$) (Tab. 11).

Cathepsin B

Zwei HS führten im Vergleich zu drei NS zu keiner signifikanten Verminderung der Cathepsin-B-Aktivität (Tab. 11).

Aminopeptidasen

Die Aminopeptidasen-Aktivität in den sieben untersuchten NF wurde durch HS im Vergleich zu NS nicht signifikant vermindert. Im Vergleich des Effektes von zwei HS zu drei NS auf die Aminopeptidasen-Aktivität in drei HCH-F war kein Unterschied nachweisbar (Tab. 11).

Tabelle 11

Effekt des Serums von Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie (HS) (n=2) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS) nach 6o Min., Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von sieben Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte 17,9 ± 1,2 µg DNS/78,5 cm^2) und von drei Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HCH-F) (Zelldichte 3o,1 ± 2,4 µg DNS/78,5 cm^2).

Mittelwerte ± SEM; + p<o,o5, ++ p<o,o25 (NS/HS)

		NS	HS
Cathepsin D	NF	614 ± 72	456 ± 63 +
	HCH-F	576 ± 152	316 ± 14o ++
Cathepsin B	NF	5,9o ± o,46	4,74 ± o,39
	HCH-F	4,49 ± o,71	4,o9 ± o,69
Aminopeptidasen	NF	59,2 ± 3,o	51,8 ± 2,o
	HCH-F	55,o ± 3,4	55,6 ± 3,2

4. Diskussion

4.1. Adaptation der Methoden zur Bestimmung der Proteasenaktivitäten in gezüchteten menschlichen mesenchymalen Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden für die Messung von lysosomalen und extralysosomalen Proteasenaktivitäten, die in umfangreichen Untersuchungen in verschiedenen Geweben von anderen Autoren erprobt wurden, auf in vitro Bedingungen von menschlichen mesenchymalen Zellen übertragen und optimiert (3,4,31).

In Übereinstimmung mit anderen Autoren fanden sich vergleichbare pH-Optima sowie Empfindlichkeit gegenüber den spezifischen Proteaseninhibitoren Pepstatin und Leupeptin (1,3,4,20,26).

Damit wurden die Voraussetzungen geschaffen, um diese Proteasenaktivitäten in gezüchteten menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten von Stoffwechselgesunden sowie in Fibroblasten von Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung und von Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie a) unabhängig und b) in Abhängigkeit von Serumfaktoren von Typ II Diabetikern und Patienten mit primärer Hypercholesterinämie zu untersuchen.

4.2. Zellulär fixierte Änderungen der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen -Aktivität in menschlichen mesenchymalen Zellen

Es konnten erstmals zellassoziierte Unterschiede zwischen gezüchteten menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten von Stoffwechselgesunden für die Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen pro µg DNS nachgewiesen werden.

Die Relevanz dieser Unterschiede für die in vivo Situation der Arterienwand ist aber noch unklar, da diese beiden Zelltypen hinsichtlich ihrer Zelldichte bei Konfluenz (Multilayer vs Monolayer) in vitro nicht unmittelbar vergleichbar sind.

Vergleichbare Proteasenaktivitäten von Diabetiker- und Normalfibroblasten schließen dichtespezifische zellassoziierte Veränderungen in dieser Hinsicht aus.

Davon unterschieden sich die niedrigen Cathepsin D-Aktivitäten in HCH-F. Infolge der um ein Drittel höheren Zelldichte (DNS/Platte) der Hypercholesterinämikerfibroblasten war die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS im Vergleich zu den Normalfibroblasten nicht in dem Ausmaß vermindert wie sie in späteren Untersuchungen der Düsseldorfer Arbeitsgruppe bei vergleichbarer Zelldichte nachgewiesen werden konnte (19). Dies ist wahrscheinlich auf den überproportionalen Anstieg der Cathepsin D-Aktivität bei höherer Zelldichte zurückzuführen (Abb. 15).

Eine zellassoziierte Verminderung der Cathepsin D-Aktivität könnte einen wichtigen Teilfaktor beim Abbau verschiedener Glyko- und Lipoproteine bilden und zu deren intra- und extrazellulärer Akkumulation über längere Zeit beitragen, wie sie für die arteriosklerotische Entwicklung charakteristisch ist.

Die Kombination des LDL-Rezeptordefektes mit einem zusätzlichen Postrezeptordefekt am lysosomalen Schlüsselenzym für den Apoprotein B-Abbau - dem Cathepsin D - bei der familiären Hypercholesterinämie könnte die Störung im LDL-Katabolismus weiter verstärken und das frühzeitige Auftreten der Arteriosklerose bei den Patienten mitverursachen.

Die normale Aminopeptidasen-Aktivität in den Hypercholesterinämikerfibroblasten belegt, daß es sich bei der verminderten Cathepsin D-Aktivität nicht um generelle Änderungen der Proteasenaktivität in den Zellen handelt.

4.3. Serumabhängige Änderungen der Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in menschlichen mesenchymalen Zellen

Mit der vorliegenden Arbeit konnten erstmals verschiedene Wirkungen von Faktoren im Serum von Typ II Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf die Aktivität lysosomaler und extralysosomaler Proteasen in gezüchteten menschlichen mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden.

Es wurde ein bisher nicht bekannter Mechanismus - die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität durch Diabetikerserum - entdeckt. Die Verminderung der Cathespsin D-Aktivität war unabhängig vom Zelltyp und von der Zelldichte nachweisbar.

Spätere Untersuchungen der Düsseldorfer Arbeitsgruppe mit LDL, einem physiologisch relevanteren Substrat, zeigten eine qualitativ gleiche Erniedrigung der Cathepsin D-Aktivität in Fibroblasten wie beim Abbau von Hämoglobin (19). Somit ist die Wirkung von DS auf Cathepsin D nicht spezifisch für ein bestimmtes Protein.

Die hier nachgewiesene Minderung der intrazellulären Cathepsin D-Aktivität durch Serumfaktoren von Typ II Diabetikern zeigt Parallelen zu Veränderungen anderer lysosomaler Enzyme beim Typ I-Diabetes mellitus, die in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Mikroangiopathien gebracht worden sind (11,15,16,18,24,25,32,33-35).

Eine Minderung der Aktivität der N-Azetyl-ß-Glukosaminidase und der sauren Cholesterinesterase ist in frisch aus dem Blut isolierten mononucleären Zellen von insulinbedürftigen Diabetikern nachgewiesen worden. Gleichzeitig wurde eine Verminderung des LDL-Proteinabbaus beschrieben (15,16). Bei Ratten mit streptozotocin-induziertem Insulinmangeldiabetes wurden Aktivitätsminderungen verschiedener Glykosidasen in Nieren-, Hirn- und Aortengewebe nachgewiesen (18,34.35).

Es ist daher möglich, daß die untersuchten Serumeffekte nicht spezifisch für den Typ II Diabetes sind, sondern bei schlechter Stoffwechseleinstellung unabhängig vom Diabetestyp wirksam werden.

Der Diabetikerserum-abhängige Anstieg der Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen hat eine Parallele im weit ausgeprägteren Anstieg der Aminopeptidasen-Aktivität des Skeletmuskels von streptozotocin-diabetischen Ratten (6,7).

Der parallele Anstieg der extra- und intrazellulären Aminopeptidasen-Aktivität zeigt aber gleichzeitig die Fähigkeit dieser Zellen, die Aktivität und extrazelluläre Abgabe verschiedener Proteasen in unterschiedlicher Weise zu regulieren.

Die Natur dieser Diabetikerserumfaktoren ist zur Zeit noch unbekannt und bedarf weitergehender Untersuchungen.

Eine ähnliche, auch im Ausmaß vergleichbare, Wirkung auf die Cathepsin D-Aktivität wie Diabetikerserum zeigte Serum von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie. Dieser Effekt wurde ebenfalls erstmals nachgewiesen.

HS beeinflußte spezifisch die Cathepsin D-Aktivität, da die parallel untersuchte lysosomale Protease Cathepsin B und die Aminopeptidasen nicht verändert wurden.

Eine Verminderung der Cathepsin D-Aktivität durch DS und HS sowie die Kombination mit der zellassoziierten Verminderung der Cathepsin D-Aktivität bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie könnte zusätzlich zu einer Verzögerung des Katabolismus verschiedener Glykoproteine wie auch der LDL in vivo und damit zu deren Anreicherung in der Arterienwand führen und die makro- und mikroangiopathischen Komplikationen beim Diabetes mellitus und der Hypercholesterinämie mitverursachen .

5. Zusammenfassung

Für die arteriosklerotischen Gefäßveränderungen beim Diabetes mellitus und bei der Hypercholesterinämie sind Störungen des Proteinabbaus mitverantwortlich. Ursache hierfür können Störungen im Bereich lysosomaler und extralysosomaler Proteasen sein.

Deshalb wurde die Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in menschlichen mesenchymalen Zellen untersucht. Voraussetzung hierfür war die Adaptation der bisher bekannten Meßmethoden für diese Proteasen auf die in vitro Bedingungen menschlicher mesenchymaler Zellen. Die Zellen wurden unter Zellkulturbedingungen untersucht, da hierbei die Möglichkeit der Differenzierung zwischen zellulär fixierten und serumspezifischen Faktoren gegeben ist.

Im einzelnen wurden folgende Fragen geprüft:

1. Sind zellulär fixierte Änderungen der Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in gezüchteten
   a) arteriellen glatten Muskelzellen
   b) Diabetikerfibroblasten
   c) Hypercholesterinämikerfibroblasten
   im Vergleich zu Fibroblasten von Stoffwechselgesunden nachweisbar?

2. werden die Aktivitäten von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen dieser menschlichen mesenchymalen Zellen durch Serumfaktoren von
   a) Typ II Diabetikern
   b) Patienten mit primärer Hypercholesterinämie
   im Vergleich zu Stoffwechselgesunden beeinflußt?

Untersucht wurden Hautfibroblasten von:
1. 4 Patienten mit primärem Typ I oder Typ II Diabetes mellitus (DF),
2. 3 Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie (HCH-F)
3. 8 Stoffwechselgesunden (NF),

sowie arterielle glatte Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden (ASMC).

Folgende Seren wurden untersucht:
1. Mischseren von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=3),
2. Mischseren von Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie (HS) (n=2),
3. Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) (n=5).

Die Zellinien wurden in der 3.-7. Passage bei 37° C in Dulbecco's Modifikation des Eagle'schen Mediums (DME) + 10% Humnaserum bis zur Konfluenz gezüchtet. Anschließend wurde im Zellhomogenat und im Inkubationsmedium die Aktivität von Cathepsin D (Testsubstrat: ^{14}C-Hämoglobin, CPM/µg DNS), Cathepsin B (Testsubstrat: N-Alpha-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid, pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (Testsubstrat: Leucin-p-nitroanilid, pkatal/µg DNS) bestimmt.

Bei der Charakterisierung der Methode zur Messung der Cathepsin D-Aktivität wurde ein pH-Optimum bei pH 3,6, eine lineare Erhöhung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (5-4o µg Protein/Test) und von der Inkubationszeit (2o-12o Min.) ermittelt.

Das pH-Optimum der Cathepsin B-Aktivität lag bei pH 5,5. Die Aktivität dieser Protease erhöhte sich linear in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (2o-8o µg Protein/Test) und von der Inkubationszeit (5-25 Min.).

Das pH-Optimum der Aminopeptidasen-Aktivität lag bei pH 7,8. Die Aminopeptidasen-Aktivität stieg linear an in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (2-2o µg Protein/Test) und von der Inkubationsdauer (2o-12o Min.).

In den ASMC betrug die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS 3o%, die Cathepsin B-Aktivität 2o% und die Aminopeptidasen-Aktivität 6 % der unter vergleichbaren Bedingungen in NF gemessenen Aktivität.

Die untersuchten Proteasenaktivitäten pro µg DNS waren bei vergleichbarer Zelldichte in Fibroblasten von Diabetikern und von Stoffwechselgesunden nicht unterschiedlich.

Im Unterschied dazu war in HCH-F im Vergleich zu NF die Cathepsin D-Aktivität um 12-31% und die

Cathepsin B-Aktivität um 14-24% vermindert. Die Aktivität der Aminopeptidasen unterschied sich nicht in HCH-F im Vergleich zu NF.

DS verminderte im Vergleich zu NS die Cathepsin D-Aktivität in NF um 37% ($p<0,05$) und in DF um 27% ($p<0,025$). DS zeigte keine unterschiedliche Wirkung auf die Cathepsin B-Aktivität in diesen Zellen. DS erhöhte jedoch im Vergleich zu NS die Aminopeptidasen-Aktivität in DF um 12 % ($p<0,05$).

Im Inkubationsmedium war kein serumabhängiger Unterschied der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität nachweisbar.

HS verminderte im Vergleich zu NS die Cathepsin D-Aktivität in NF um 26 % ($p<0,05$) und in HCH-F um 46 % ($p<0,025$), während die Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität nicht signifikant vermindert wurden.

Die zellassoziierte Verminderung der Cathepsin D-Aktivität in HCH-F sowie die erstmals nachgewiesene Verminderung der intrazellulären Cathepsin D-Aktivität durch DS und HS in mesenchymalen Zellen könnten ein wichtiger Faktor beim Abbau von Glyko- und Lipoproteinen in der arteriellen Gefäßwand des Menschen sein. Die daraus resultierende intra- und extrazelluläre Akkumulation dieser Proteine könnte wesentlich zu den frühzeitigen arteriosklerotischen Veränderungen beim Diabetes mellitus und bei der Hypercholesterinämie beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Amenta, J.S.
   Sargus, M.J.
   Venkatesan, S.
   Shinozuka, H.
   Role of the vacuolar apparatus in augmented protein degradation in cultured fibroblasts.
   J. Cell Physiol. 94, 77 (1978)

2. Barill, M.F.
   General principles of isolation and detection of mykoplasmas.
   INSERM 33, 135 (1974)

3. Barret, A.J.
   Cathepsin B and other thiol proteinases.
   In: Proteinases in Mammalian Cells und Tissues. A.J. Barret (edit.), 181 (1977) Elsevier/ North-Holland, Biomedical Press

4. Barret, A.J.
   Cathepsin D and other carboxyl proteinases.
   In: Proteinases in Mammalian Cells und Tissues. A.J. Barret (edit.), 210 (1977) Elsevier/ North-Holland, Biomedical Press

5. Coffey, J.W.
   de Duve, Ch.
   Digestive Activity of Lysosomes, 1. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes.
   J. Biol. Chem. 243, 3255 (1968)

6. Dahlmann, B.
Reinauer, H.
Schroeter, C.
Herbertz, L.
Myofibrillar protein degradation and muscle proteinases in normal and diabetic rats.
Biochem. Med. 21, 33 (1979)

7. Dahlmann, B.
Reinauer, H.
Purification and some properties of an alkaline proteinase from rat skeletal muscle.
Biochem. J. 171, 803 (1978)

8. Duhault, J.
Bure, J.
Lonchampt, M.
Beert, L.
Boulanger, M.
Variations of biosynthesis in endothelial cells cultured in normal and abnormal conditions related to diabetes.
In: Cellular and Biochemical Aspects in Diabetic Retinopathy. Inserm Symposium No 7, Regnault, F., Duhault, J. (eds.), 15 (1978), Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

9. Dulbecco, R.
Freeman, G.
Plaque production by the polyoma virus.
Virology 8, 396 (1959)

10. Dulbecco, R.
Vogt, M.
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J. Exp. Med. 99, 167 (1960)

11. Fushimi, H.
Tarui, S.
Retina, tear and serum beta-N-acetylglucosaminidase activities in diabetic patients.
Clin. Chim. Acta 71, 1 (1976)

12. Garcia, M.J.
McNamara, P.M.
Gordon, T.
Kannel, W.B.
Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study.
Diabetes 23, 1o5 (1974)

13. Gries, F.A.
Koschinsky, T.
Berchtold, P.
Obesity, diabetes and hyperlipoproteinemia.
Atherosclerosis Reviews 4, 71 (1979)

14. Hasilik, A.
Neufeld, E.F.
Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts.
J. Biol. Chem. 255, 1937 (198o)

15. Henze, K.
Chait, A.
Insulin treatment of diabetes enhances lysosomal enzyme activity and low density lipoprotein (LDL) degradation by circulating mononuclear cells (MC).
Diabetes 29, (Suppl.) 11A (198o)

16. Henze, K.
Chait, A.
Lysosomal enzyme activities and low density lipoprotein receptors in circulating mononuclear cells.
Diabetologia 2o, 625 (1981)

17. Hinegardner, R. An improved fluorometric assay for DNA. Analyt. Biochem. 39, 197 (1971)

18. Juretić, D. Lipovac, K. Hadzija, M. Slijepcevic, M. The activities of glycosidases in diabetic rats. Diabetologia 15, 243 (1978)

19. Koschinsky, T. Angeborene und erworbene Stoffwechselstörungen in arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten bei Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämien. - Zellkulturuntersuchungen zu Faktoren der Arteriosklerosenentwicklung-. Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät, (1982)

2o. Lie, S.O. Schofield, B.H. Taylor, H.A. Doty, S.B. Structure and function of the lysosomes of human fibroblasts in culture: Dependece on medium pH. Pediat. Res. 7, 13 (1973)

21. Louvard, D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4132 (198o)

22. Lowry, C.M.
Rosebrough, N.J.
Farr, A.L.
Randall, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

23. Nakai, T.
Otto, P.S.
Whayne, T.F.
Proteolysis of canine apolipoprotein by acid proteases in canine liver lysosomes.
Biochim. Biophys. Acta 422, 38o (1976)

24. Peters, T.J.
de Duve, C.
Lysosomes of the arterial wall. Part II: Subcellar fractionation of aortic cells isolated from rabbits with experimental atheroma.
Exp. Mol. Pathol. 2o, 228 (1974)

25. Pitkänen, E.
Kyllästinen, M.
Koivula, T.
Hormila, P.
ß-N-acetylglucosaminidase and ß-glucuronidase activities in insulin-dependent diabetic subjects with retinopathy.
Diabetologia 18, 275 (198o)

26. Rome, L.H.
Garvin, A.J.
Allietta, M.M.
Neufeld, E.F.
Two species of lysosomal organelles in cultered human fibroblasts.
Cell 17, 143 (1979)

27. Ross, R.
Glomset, J.A.
Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell.
Science 18o, 1332 (1973)

28. Roth, J.S.
Losty, T.
Wierbicki, E.
Assay of proteolytic enzyme activity using a ^{14}C-labeled hemoglobin.
Analyt. Biochem. 42, 214 (1971)

29. Shinomiya, M.
Matsucka, N.
Shirai, K.
Saito, Y.
Kumagai, A.
Studies on cholesterol esterase in rat arterial wall.
Atherosclerosis 33, 343 (1979)

3o. van der Westhuyzen, D.R.
Gevers, W.
Coetzee, G.A.
Cathepsin D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low density lipoprotein.
Eur. J. Biochem. 112, 153 (198o)

31. Wachsmuth, E.D.
Fritze, I.
Pfleiderer, G.
An aminopeptidase occuring in pig kidney. I. An improved method of preparation. Physical and enzymic properties.
Biochemistry 5, 169 (1966)

32. Wolinsky, H.
A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis.
Circ. Res. 47, 3o1 (198o)

33. Wolinsky, H.
Capron, L.
Goldfischer, S.
Capron, F.
Coltoff-
Schiller, B.
Kasak, L.

Hydrolase activities in the rat aorta: II. Effects of hypertension alone and in combination with diabetes mellitus
Circ. Res. 42, 831 (1978)

34. Wolinsky, H.
Goldfischer, S.
Capron, L.
Capron, F.
Coltoff-
Schiller, B.
Kasak, L.

Hydrolase activities in the rat aorta: I. Effects of diabetes mellitus and insulin treatment.
Circ. Res. 42, 821 (1978)

35. Wolinsky, H.
Katz, L.
Markle, R.
Mills, J.
Brem, S.
Wassertheil-
Smoller, S.

Hydrolase activities in the rat aorta: IV. Relation between clearance rates of circulating ^{125}J-labeled low-density-lipoproteins and levels of tissue hydrolase activities.
Circ. Res. 47, 433 (1980)

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gries für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinauer danke ich für die Unterstützung bei der experimentellen Ausführung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Koschinsky für seine Betreuung, für die zahlreichen wertvollen Anregungen sowie für das starke Interesse, mit dem er die Ausführung dieser Arbeit begleitet hat.

Herrn Dr. Dahlmann bin ich dankbar für seine Betreuung während der experimentellen Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dipl. Biologin Bünting danke ich für die Anzüchtung der untersuchten Zellinien.

Lebenslauf:

Am 28. Januar 1949 wurde ich, Irmgard Dieckmann, als Tochter des Arbeiters Franz-Josef Dieckmann und seiner Ehefrau Katharina, geb. Franke, in Wuppertal-Elberfeld geboren.
Von 1955 - 1959 besuchte ich die Volksschule in Lüdinghausen und im Anschluß daran bis 1965 das dortige Gymnasium. Nach einer Lehre als Bauzeichnerin in den Jahren 1965-1967 mit abschließender Gehilfenprüfung begann ich eine Ausbildung zur staatl. geprüften Wirtschafterin, die ich im März 1969 abschloß.
In den folgenden Jahren war ich als Wirtschafterin im Familienferienheim Föckinghausen, bei Monsieur S. de Coulon in Neuchâtel und beim Sozialwerk der LVA-Rheinprovinz in Düsseldorf tätig.
Von August 1972 an habe ich das Abendgymnasium der Stadt Düsseldorf besucht und dort im Dezember 1975 das Abitur abgelegt.
Zum Sommersemester 1976 bekam ich einen Studienplatz im Fachbereich Medizin an der Universität Düsseldorf.
Im März 1978 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im März 1979 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im März 1981 den Zweiten der Ärztlichen Prüfung.

Nach dem Praktischen Jahr am Marienhospital in Düsseldorf legte ich im April 1982 den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.
Seit dem 1. Juni 1982 bin ich als Assistenzärztin in der Inneren Abteilung des Remigius-Krankenhauses in Leverkusen-Opladen tätig.

Irmgard Dieckmann